

Expressionen av PD-L1 och PD-1 i mjukvävnadssarkom

Simon Lindholm

Medicine kandidat, Helsingfors universitet

Avdelningen för patologi

Handledare: Tom Böhling, Mika Sampo

1. HELSINGIN YLIOPISTO – HELSINGFORS UNIVERSITET

Tiedekunta/Osasto – Fakultet/Sektion – Faculty		Laitos – Institution – Department	
Medicinska fakulteten		Avdelningen för patologi	
Tekijä – Författare – Author			
Simon Lindholm			
Työn nimi – Arbetets titel – Title			
Expression av PD-L1 och PD-1 i mjukvävnadssarkom			
Oppiaine – Läroämne – Subject			
Patologi			
Työn laji – Arbetets art – Level		Aika – Datum – Month and year	
Fördjupande studie			
Sivumäärä – Sidoantal - Number of pages			
Tiivistelmä – Referat – Abstract			
<p>Programmed death protein 1 (PD-1) är en immunsuppressiv ytreceptor på aktiverade mördar-T-celler. På de flesta av kroppens egna celler finns en ligand, programmed death ligand 1 (PD-L1), som binder till PD-1, och inaktiverar mördar-T-cellerna. Detta är en viktig mekanism med vilken kroppen förhindrar autoimmunitet. Tumörceller kan undgå mördar-T-cellerna genom att uppreglera expressionen av PD-L1 på sin yta.</p> <p>I den här studien undersöks hur stor del av mjukvävnadssarkom som uttrycker PD-L1 på sin yta, och hur många fall som innehåller PD-1-aktiverade CD8-celler. Mjukvävnadssarkom omfattar under en procent av all cancer hos vuxna.</p> <p>Sammanlagt 1128 fall inkluderade i 13 TMA-block färgades immunohistokemiskt med PD-1 respektive PD-L1 antikroppar. Preparatens mikropskopbilder skannades och undersöktes i CaseViewer, ett program som stöder digital histopatologisk undersökning. Av de undersökta preparaten var PD-1 expressionen överlag låg, mest PD-1 uttrycktes bland synovialsarkomen. Expressionen av PD-L1 var varierande, den högsta expressionen hade myxofibrosarkomen (53,2%).</p> <p>Idag finns det ännu inte någon specifik vård för sarkom, vården består av kirurgisk excision, strålbehandling och kemoterapi. Då patientens vård planeras är det essentiellt att veta ifall tumörcellerna uttrycker PD-L1, i vilka fall patienten kan vara passande för immunoterapi med PD-L1 antikroppar. Antikropparna binder till PD-1, utan att inaktivera CD8-cellen, vilket möjliggör dess immunologiska funktion och förstörelse av tumörcellen. Patienter vars tumörceller uttrycker PD-L1 har en bättre prognos med immunoterapi.</p>			
Avainsanat – Nyckelord – Keywords			
mjukvävnadssarkom; PD-1; PD-L1; programmed death protein 1; programmed death ligand 1; immunoterapi; PD-L1 antibodies; immunohistokemi; CaseViewer			

Säilytyspaikka – Förvaringställe – Where deposited
Muita tietoja – Övriga uppgifter – Additional information

Introduktion och litteraturöversikt

Mjukvävnadssarkom

Mjukvävnadssarkom är en sällsynt cancersjukdom. De är elakartade tumörer, som uppkommer primärt i mesenkymal vävnad, det vill säga i fibrös, fett, tvärstrimmig- och glatt muskelvävnad, blod- och lymfkärl, samt synovialvävnad. Mjukvävnadssarkom omfattar under en procent av all cancer hos vuxna. Incidensen är 3 - 4/100 000, och årligen rapporteras 120 - 150 nya fall av mjukvävnadssarkom till cancerregistret i Finland. Den typiska patienten är över 60 år gammal [1,2]. Så gott som alla mjukvävnadstumörer utgår från multipotentiella stamceller som är programmerade att differentieras till en bestämd vävnad, tumörerna kan inte uppkomma i mogna celler, eftersom de redan är slutligt differentierade. Tumörerna antas uppkomma spontant *de novo* utan några bakomliggande exponerande faktorer. De flesta mjukvävnadssarkom väcker inte någon allmän inflammationsrespons, de är ofta symptomfria och kan därför växa sig mycket stora innan de upptäcks. Likt många andra cancersjukdomar kan mjukvävnadssarkom sprida sig via blodet och metastasera till lungor eller lever [3]. Lymfvävnadsmetastaser är ändå rätt så ovanliga vid sarkom om man jämför med t.ex. bröstcancer. Diagnosen av mjukvävnadssarkom försvåras av att det finns så många differentialdiagnostiska alternativ, t.ex. kan ett liposarkom misstas för ett godartat lipom.

Gradering av mjukvävnadssarkom

Prognosen fastställs baserat på tumörens storlek, lokalisation och med hjälp av graderingssystem, som är baserade på tumörnekros, tumörcellernas differentiering, och mitotisk aktivitet (Tabell 1) [4,5]. Syftet med gradering är få ett estimat på tumörens tillväxthastighet, metastasrisken, och utgör således ett viktigt prognostiskt verktyg. Låggradiga tumörer är i regel lokalt aggressiva och metastaserar sällan, medan höggradiga tumörer har en hög risk för återfall och metastaser. De två histologiska graderingssystem som används mest idag är utvecklade av National Cancer Institute och French Federation of Cancer Centers Sarcoma Group [4,5]. Båda systemen är 3-gradiga och baserade på tre parametrar; sarkomets histologiska undergrupp, tumörnekros, och tumörcellernas mitotiska aktivitet (TABELL och bild 1).

Parameter	Fynd	Poäng
Differentiering	Påminner starkt om normal mesenkymalvävnad (t.ex. lågradigt leiomyosarkom)	1
	Histologiska gruppen kan fastställas (t.ex. myxoid liposarkom)	2
	Embryonal, odifferentierade eller okänd vävnad (t.ex. synovialsarkom, osteosarkom)	3
Mitotisk aktivitet /10HPF)	0-9	1
	10-19	2
	20 eller flera	3
Tumörnekros	Ingen	0
	Under 50%	1
	Över 50%	2
Summan av de tre parametrarna	Grad	
2-3	Grad I	
4-5	Grad II	
6-8	Grad III	
HPF = High-power field		
Tabell 1. Definiering av graderingsparametrar		

För att kunna utföra gradering behövs representativt material som oftast tas genom grovnålsbiopsi från tumören. Graderingen kan bli fel ifall tumören är mycket heterogen. Gradering måste utföras på obehandlade tumörer, eftersom kemoterapi och strålbehandling kan minska tumörcellernas mitotiska aktivitet, krympa tumören, leda till nekros och således ge en felaktig gradering.

Comparison of the NCI and FNCLCC systems for the histological grading of soft tissue tumours

Histological type	NCI grading system	FNCLCC grading system
Well differentiated liposarcoma	1+ ^(*)	1
Myxoid liposarcoma	1+	2
High grade myxoid liposarcoma (round cell liposarcoma)	2- ^(**) 3	3
Pleomorphic liposarcoma	2 3	3
Dedifferentiated liposarcoma		3
Fibrosarcoma		
Well differentiated	1+	1
Conventional	2	2
Poorly differentiated	3	3
Pleomorphic sarcoma (MFH, pleomorphic type)		
With storiform pattern	2	2
Patternless pleomorphic sarcoma	3	3
With giant cells		3
With prominent inflammation		3
Myxofibrosarcoma (MFH, myxoid-type)	1+ 2 3	2
Leiomyosarcoma		
Well differentiated	1+	1
Conventional	2	2
Poorly differentiated / pleomorphic / epithelioid	3	3
Pleomorphic rhabdomyosarcoma	2 3	3
Embryonal / alveolar rhabdomyosarcomas	3	3
Myxoid chondrosarcoma	1 2 3	
Mesenchymal chondrosarcoma	3	3
Osteosarcoma	3	3
Ewing sarcoma / PNET	3	3
Synovial sarcoma	2 3	3
Epithelioid sarcoma	2 3	
Clear cell sarcoma	2 3	
Angiosarcoma	2 3	
Modified from Costa et al (401), Costa (402) and Guillou (851). The original diagnostic terms are shown in parentheses. MFH: malignant fibrous histiocytoma; PNET: primitive neuroectodermal tumour. (*) + grade is attributed by a combination of histological type, cellularity, pleomorphism and mitotic rate. (**) - grade is attributed according to the extent of tumour necrosis (< or > 15%).		

Bild 1.

Staging av mjukvävnadssarkom

Mjukvävnadssarkomens utbredning bestäms med hjälp av TNM-systemet. T hänvisar till tumörens storlek och omfång, N till antalet omkringliggande lymfnoder som har cancer, och M till metastaser (Tabell 2).

Tumören (T)	Förklaring	Definition
T1-4	Ju större siffra efter T, desto större är tumörens diameter (d)	$d < 5 \text{ cm}$ (T1), $5 \text{ cm} < d < 10 \text{ cm}$ (T2), $10 \text{ cm} < d < 15 \text{ cm}$ (T3), $d > 15 \text{ cm}$ (T4)
Lymfnoder (N)		
N0	Cancer i lymfnoder finns inte	
N1-3	Ju större siffra efter N, desto flera lymfnoder innehåller cancerceller	Metastaser i regionala lymfnoder (N1, metastaser spritt sig mellan N1 och N3 (N2), metastaser hittas i distala lymfnoder (N3)
Metastaser (M)		
M0	Ingen metastasering	
M1	Tumören har metastaserat till andra organ i kroppen utöver lymfnoder.	
Stage IA	T1, N0, M0, G1 eller Gx	Diameter mindre än 5cm (T1), ingen cancer i lymfnoder (N0), inga metastaser (M0) och tumörens grad antingen 1 eller kan inte fastställas
Stage IB	T2, N0, M0, G1 eller Gx	Diameter större än 5 cm, ingen cancer i lymfnoder (N0), inga metastaser (M0) och tumörens grad antingen 1 eller kan inte fastställas
Stage IIA	T1, N0, M0, G2 eller G3	Tumören mindre än 5cm (T1), ingen cancer i lymfnoder (N0), inga metastaser (M0), tumörens grad är 2 eller 3
Stage IIB	T2, N0, M0, G2	Tumören större än 5cm (T2), ingen cancer i lymfnoder (N0), inga metastaser (M0), tumörens grad är 2
Stage IIIA	T2, N0, M0, G3	Tumören större än 5cm (T2), ingen cancer i lymfnoder (N0), inga metastaser (M0), tumörens grad är 3
Stage IIIB	Vilket T som helst, N1, M0, vilket G som helst	
Stage IV	Vilket T som helst, vilket N som helst, M1, vilket G som helst	Tumören har metastaserat
Tabell 2. TNM för mjukvävnadssarkom		

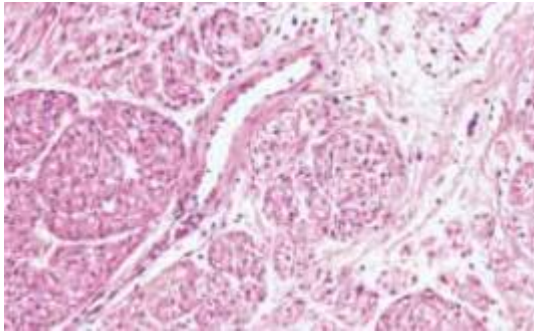
Epidemiologi och histologi

Alla sarkom är sällsynta, incidensen är uppskattad till 3 - 4 fall per 100 000 individer, och godartade mjukvävnadstumörer är 100 gånger vanligare än elakartade tumörer. En av teorier till att mjukvävnadssarkom är så sällsynta kan vara att mesenkymala cellerna ligger bakom skyddande barriärer av epitel. Många sarkom förekommer mer frekvent hos män än kvinnor, med undantag av leiomyosarkom, som är vanligare hos kvinnor. Likt många andra former av cancer, förekommer sarkom mest hos äldre personer, men vissa typer av sarkom har karaktäristiska målgrupper, t.ex. rabdomyosarkom hos barn och unga [6].

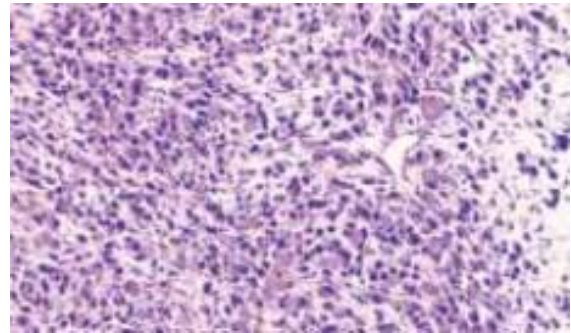
Etiologi

Etiologin bakom mjukvävnadssarkom är relativt illa förstådd jämfört med andra former av cancer. Sarkom har olika etiologiska faktorer, men tumörspecifika translokationer kan hittas i många sarkom. Miljöfaktorer som bakomliggande orsak till sarkom är väldigt ovanligt. Sarkom uppkommer sällan på grund av några bakomliggande exponerande faktorer, men det är inte omöjligt ifall man utsätts för joniserande strålning, onkogen virus (HHV8 är associerat med Kaposi sarkom, medan EBV är associerat med leiomyosarkom), kemikalier (växtgifter, alkohol, organiska lösningsmedel), kronisk inflammation, samt värdspecifika faktorer (immunosuppression, kroniskt lymfödem) [7-9]. Egenskaperna för några vanliga sarkomtyper finns i Tabell 3 och histologi i Bild 2.

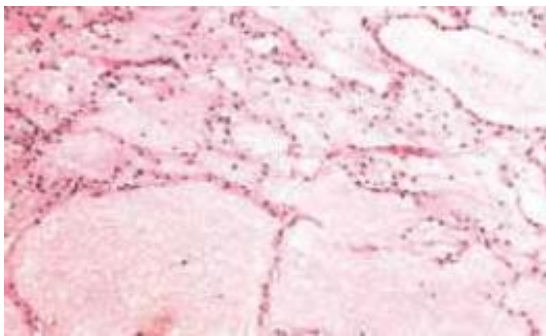
Histologisk undergrupp	Epidemiologi	Genetik	Gradering (FNCLCC)
Väldifferentierat liposarkom	50% av alla liposarkom, vanligast hos 50-60 åringar, män och kvinnor drabbas lika ofta	Amplifikationer i kromosom 12q vanliga.	1
Odifferentierat liposarkom	Ovanlig form av liposarkom. Mera tidsberoende än platsberoende.	Amplifiering i 12q13-21 regionen	3
Myxoid-rundcelligt liposarkom	Nästvanligaste liposarkomet (30-35% av liposarkomen).	Translokation i t(12;16)(q13;p11) i 90% av fallen, alternativt t(12;22)(q13;q12).	2 (myxoid) och 3 (rundcelligt)
Angiosarkom	Uppkommer relativt jämnt under livets årtionden, ovanligt under barndomen	Ingen specifik abnormalitet har identifierats	2-3
Myxofibrosarkom	Myxofibrosarkom hör till de vanligaste sarkomen hos äldre (60-80 år)	Förlorad 6p, addition av 9q och 12q	2
Synovialsarkom	90% av fallen drabbas unga vuxna (<50 år)	Karaktäristisk translokation; t(X;18)(p11;q11)	3
Tabell 3. Exempel på sarkom och deras egenskaper			



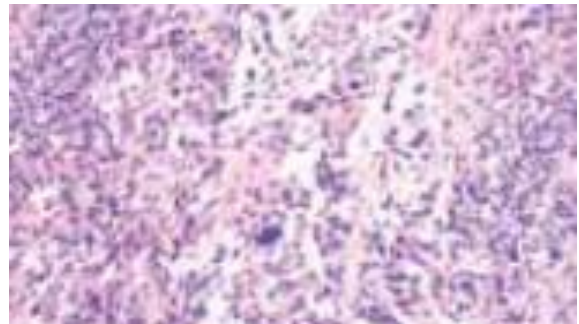
Väldifferentierat leiomyosarkom



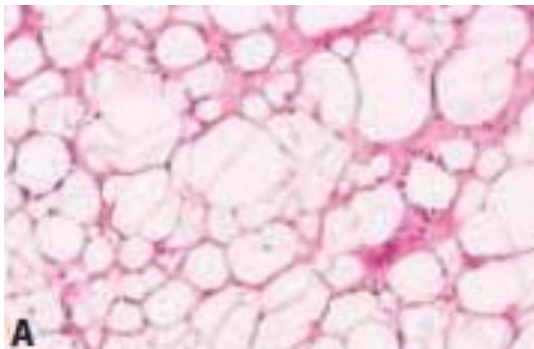
Angiosarkom



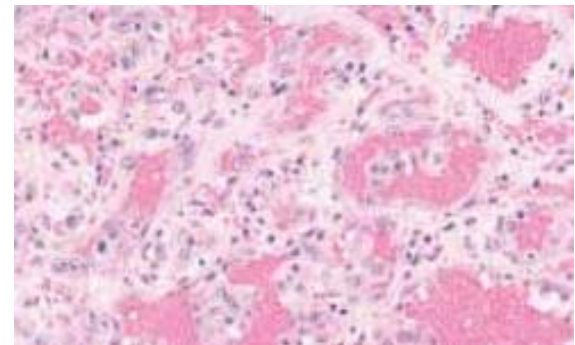
Väldifferentierat fibrosarkom



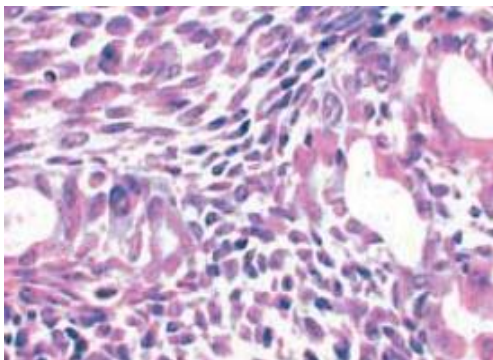
Myxofibrosarkom



Väldifferentierat liposarkom



Odifferentierat liposarkom



Synovialsarkom

Bild 2. Histologiska bilder på några sarkom [6].

Behandling

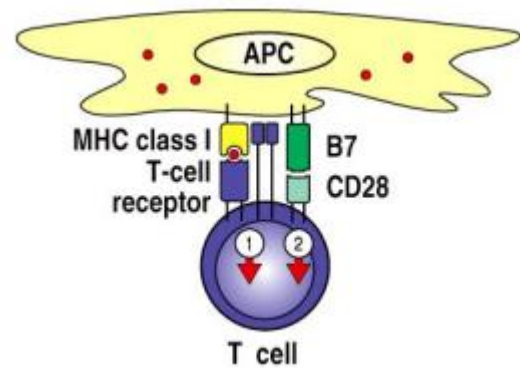
Behandlingen vid mjukvävnadssarkom är främst beroende av sarkomets grad, och behandlingen är i stort sett samma för alla sarkomundergrupper. Mjukvävnadssarkom behandlas alltid med en möjligast fullständig excision av tumören, resultatet är avgörande för prognosen. Excisionen inkluderar själva tumören och en 1 - 2 centimeters marginal i försök att få bort mikroskopiska tumörutskott [10]. För låggradiga tumörer räcker excision av tumören som behandling, om tumörens läge tillåter det. Höggradiga tumörer eller tumörer som uppkommit på svåråtkomliga ställen (t.ex. i retroperitoneum) kan behandlas preoperativt med cytostatika och strålningsbehandling, för att minska tumörens storlek och underlätta excisionen [11,12]. För höggradiga tumörer kan man använda en kombination av postoperativ cytostatika och strålbehandling för att hindra metastaser, återfall, och för att förstöra tumörens mikroskopiska utskott [13]. Det finns för tillfället inga sarkomspecifika läkemedel för neoadjuvant vård, men nya läkemedel finns i marknaden för palliativ vård, bl.a. trabectedin för liposarkom [14] och pazopanib för icke-liposarkom (Tabell 4) [15]. Immunsystemets förmåga att bekämpa tumörcellerna, genom s.k. immunoterapi forskas också vid mjukdelssarkom [16].

Cytostatika	Verkningsmekanism
Doxorubicin	Inhiberar DNA replikationen genom att stoppa topoisomeras II
Ifosfamid	Alkylering av DNA, fäster N-7 till guanins reaktiva del
Trabectedin	Hindrar transkriptionsfaktorn FUS-CHOP från att binda till DNA, vilket främjar differentiering

Tabell 4. Exempel på cytostatika som lämpar sig för behandling av mjukvävnadssarkom

Programmed Cell Death Protein 1 och Programmed Death-Ligand 1

T-cellen har immunologiska kontrollpunkter. En kontrollpunkt är något t.ex. en receptor, som reglerar en aktivitet. En naiv, d.v.s. inaktiv T-cell behöver två faktorer för att aktiveras till en effektcell. Den behöver en antigen som ska binda till T-cellens CD8 (Cluster of Differentiation 8). Antigenen är i andra ändan bunden till en antigenpresenterande cell (APC t.ex. dendritcells) MHC-I. Utöver detta behövs



Aktivering av en naiv T-cell kräver en B7-molekyl och en antigen.

en kofaktor, membranproteinet B7 (finns på APC), som ska binda till CD28 på T-cellens membran.

PD-1 (CD279, programmed death protein 1) är en immunologisk suppressiv kontrollpunkt hos aktiverade cytotoxiska T-celler. PD-L1 (programmed death-ligand 1) finns på de flesta friska celler. Då PD-L1 binder till PD-1, rekryterar PD-1 SHP-2, som defosforylerar och inaktiverar Zap 70, en viktig länk i de cytotoxiska T-cellernas receptormedierade signalering. Till följd av detta minskar de cytotoxiska T-cellernas proliferation och deras funktioner, som t.ex. produktionen av IFN- γ , en för immunförsvaret viktig cytokin. Det här leder till en nedsatt immunrespons. Tumörceller kan undvika att förstöras av cytotoxiska T-celler genom att uppreglera PD-L1. PD-L1 finns på många av kroppens egna vävnader, vilket är essentiellt eftersom liganden genast finns till hands då PD-1 ska inaktiveras för att förhindra autoimmunitet [17,18]. Tidigare immunoterapier har fokuserat på att öka T-cellernas aktivitet. Genom att istället försöka förhindra att PD-L1 kommer åt att binda till PD-1, och följaktligen inaktivera T-celler, tar man bort de immunologiska bromsarna, vilket resulterar i en effektivare immunrespons.

Exempelstudie; Pembrolizumab (anti-PD-1) versus kemoterapi [19]

I en studie som omfattade 305 patienter med tidigare obehandlad och avancerad icke-småcellslungcancer jämfördes effektiviteten av pembrolizumab med kemoterapi [19]. Hos alla patienter var tumörcellernas positivitet för PD-L1 över 50%. Patienterna delades slumpmässigt

in i två grupper, den ena gruppen fick pembrolizumab och den andra genomgick kemoterapi. Gruppen som behandlats med pembrolizumab hade en 10,3 månader lång period, under vilken sjukdomen inte framskred. Dessutom upplevde endast 73,4% av gruppen bieffekter, och överlevnadesprocenten vid 6 månader var 80,2%. Kemoterapigruppen upplevde en utvecklingsfri period på 6 månader, bieffekter upplevdes av 90% och överlevnaden vid 6 månader var 72,4%. Pembrolizumab hindrade sjukdomens framfart, förbättrade överlevnadsprocenten, och minskade bieffekterna.

Namn	Verkningsmekanism	Indikation
Pembrolizumab	Anti-PD-1 antikropp	Icke-småcellig lungcancer
		Melanom
Nivolumab	Anti-PD-1 antikropp	Melanom
		Icke-småcellig lungcancer
		Njurcellskarcinom
Atezolizumab	Anti-PD-L1 antikropp	Metastaserande icke-småcellig lungcancer
		Urotelkarcinom
Durvalumab	Anti-PD-L1 antikropp	Icke-småcellig lungcancer
		Urotelkarcinom
Pidilizumab	Anti-PD-1 antikropp	Stort B-cellslymfom
Avelumab	Anti-PD-L1 antikropp	Merkelcellskarcinom
		Icke-småcellig lungcancer

Tabell 5. Nuvarande PD-1 och PD-L1 inhibitorer (9)

Frågeställning

Den här studien omfattar 1128 vävnadsprov, och gjordes i ett försök att kartlägga PD-L1/PD-1 expressionen i nio olika undergrupper av mjukvävnadssarkom. I studien har vi försökt få svar på frågan huruvida det finns histologiska undergrupper som har en högre grad av expression, respektive mindre grav av expression. Överexpression av PD-L1/PD-1 har redan tidigare rapporterats ha en negativ inverkan på prognosen, och skulle man lyckas tillförlitligt koppla ihop en histologisk undergrupp med en ökad expression kunde man med bättre resultat vårda patienten med immunoterapi.

Metoder

Tissue Microarrays

Tissue microarrays (TMA) är paraffinblock, där man till samma paraffinblock överfört hundratals representativa vävnadscylinrar för histologisk analys [20]. Intressanta provbitar ur en paraffininbäddad vävnad överförs till ett paraffinblock, varefter blocket skärs i tunna skivor med en mikrotom. Skivorna färgas sedan immunohistokemiskt för vidare analys [21]. TMA är speciellt användbart vid analys av cancerprov. I de TMA-block som inkluderades i denna studie fanns totalt 1 128 vävnadscylinrar från patienter som behandlats för sarkom åren 1987 – 2014.

Immunohistokemisk färgning

Immunohistokemisk färgning är en diagnostisk grundpelare. Antigener identifieras ur ett vävnadsprov med hjälp av antigenspecifika antikroppar bundna till ett färgämne. Färgämnet kan sedan ses i mikroskop för att lokalisera antigenen.

PD-L1 immunohistokemisk färgning (IHC)

I samband med blockens fixering maskeras proteiner och antigener. PD-L1 glasen avparaffinerades i en serie etanol med olika koncentrationer och rehydrerades i avjoniserat vatten med hjälp av Leica ST5010 Autostainer XL. Vävnadens ursprungliga struktur innan fixeringen återficks genom värmeinducerad epitopåtervinning. Blocken placerades i en behållare innehållande en buffertlösning (Target), som sedan hettades upp i en mikrovågsugn (7+7+5+5 minuter). PD-L1 glasen fick svalna tjugo minuter i rumstemperatur, varefter de överfördes till en lösning 1xPBS. Som detektionskit användes Quanto och antikroppen PD-L1 (Spring Bioscience), utspädd till 1:200. Inkuberingstiden var 30 minuter i rumstemperatur. Färgningen sköttes med LabVision Autostainer, varefter cellernas kärnor färgades (Meyers hematoxylin, Lillies Modification, Dako), och glasen behandlades med en stigande alkoholserie. Till slut övertäcktes glasen med skyddsplast [22].

PD-1 immunohistokemisk färgning

PD-1 glaset förbehandlades i Ventana BenchMark XT. Till förbehandlingen användes standard Cell Conditioning 1 (CC1). CC1 är en trisbaserad buffer med svag basisk pH, som vid upphettning bryter de kovalenta bindningarna som bildats i den formalinbehandlade vävnaden. CC1 gör vävnaden mer tillgänglig för detektion med antikroppar. I vår studie inkuberades vävnaden 24 minuter i rumstemperatur med antikroppen Abcamin (ab52587) utspädd till 1:100. Som detektionskit använde vi UltraVIEW RED (Roche). Färgningen gjordes i LabVision Autostainer, varefter cellernas kärnor färgades på samma sätt som PD-L1. Till slut övertäcktes PD-1 glaset med skyddsplast [22].

Undersökning och analys

Provens histologiska sammansättning undersöktes med mikroskop och skannades. Skanningarna undersöktes i CaseViewer (3DHISTECH Ltd. 2005 - 2016.) CaseViewer är ett program som stöder digital histopatologisk undersökning, som ett digitalt mikroskop. De tumörceller som var positiva för PD-L1 färgades i olika nyanser av brunt, beroende på tätheten av PD-L1 på tumörcellernas membranyta. Samma princip gällde för PD-1, ifall det fanns cytotoxiska T-celler i biopsin. Ett problem med immunohistokemisk PD-L1 färgning är att varje anti-PDL-1-antikropp har en egen cut-off, som bör beaktas [23,24]. I den här studien användes Dako REAL som har en cut-off på en procent, det vill säga minst en procent av plasmamembranen bör ha färgats för att provet i sin helhet ska godkännas som positivt.

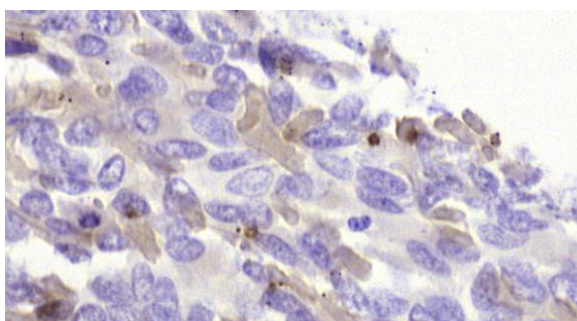
Resultat

1128 biopsier från patienter hade fixerats med formalin på 13 olika TMA-block och inbäddats i paraffin. Av de undersökta proven i min studie var PD-1 expressionen överlag låg, mest PD-1 uttrycktes bland synovialsarkomen (4/90, 4,4%) och myxofibrosarkomen (4/94, 4,3%). Av PD-L1 uttryckte myxofibrosarkomen mest (50/94, 53,2%), följt av UPS (undifferentiated pleomorphic sarcoma, 198/476, 41,6%), sarkom NOS (sarcoma not otherwise specified (27/68, 39,7%) och liposarkom (71/190, 37,4%). Minst PD-L1 uttrycktes bland leiomyosarkomen (27/124, 21,8%), MPNST (malignant peripheral neural sheath tumor, 8/40, 20%), fibrosarkom (4/36, 11,1%) och synovialsarkomen (4,44%).

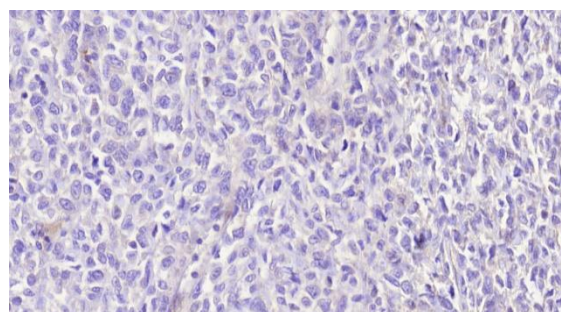
Tabell 6. PDL-1 och PD-1 expression i mjukvävnadssarkom

Histologi	Totalt antal	Antal (procent) positiva för PD-L1	Antal (procent) positiva för PD-1	Antal oläsliga prov för PD-L1	Antal oläsliga prov för PD-1
Liposarkom (G2)	190	71 (37,4%)	0 (0%)	10	15
Fibrosarkom (G2-4)	36	4 (11,1%)	0 (0%)	10	8
Fibromyxosarkom (G2)	10	2 (20%)	0 (0%)	0	0
Leiomyosarkom (G2-4)	124	27 (21,8%)	0 (0%)	4	13
UPS	476	198 (41,6%)	6 (1,26%)	48	40
Myxofibrosarkom	94	50 (53,2%)	4 (4,3%)	8	12
Sarkom NOS	68	27 (39,7%)	2 (2,94%)	6	5
Synovialsarkom	90	4 (4,44%)	4 (4,44%)	5	5
MPNST	40	8 (20%)	0 (0%)	1	1

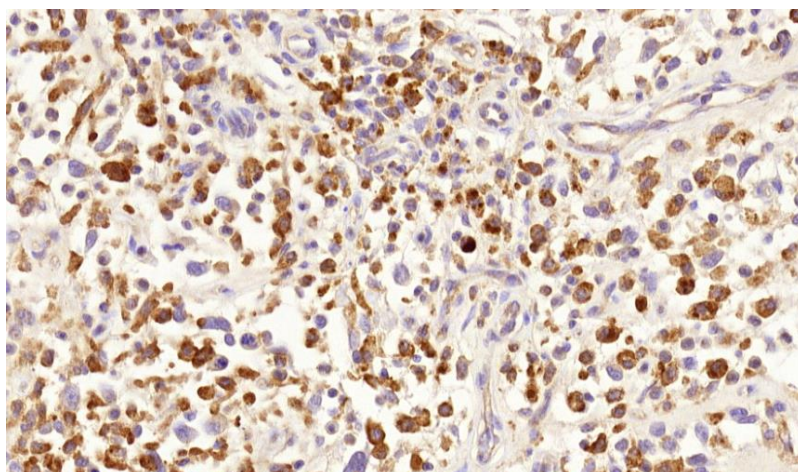
MPNST malignant peripheral neural sheath tumor; NOS not otherwise specified; UPS undifferentiated pleomorphic sarcoma



PD-1 positiv IHC färgning. (x400)



PD-L1 negativ IHC färgning. (x200)



PD-L1 positiv IHC färgning. (x200)

Diskussion

Överexpression av PD-L1 har redan tidigare kopplats ihop med en sämre prognos vid mjukvävnadssarkom. [23, 24] I den här studien har vi undersökt expressionen av PD-L1 och PD-1 i nio olika histologiska undergrupper av mjukvävnadssarkom. PD-1/PD-L1-axeln och dess prognostiska signifikans är inte obeträdd mark, men inga studier av den här storleken har gjorts tidigare. En av den här studiens fördelar har varit den stora materialstorleken, 1128 prov, med nio olika histologiska undergrupper. Ett allmänt hinder är att det är svårt att klart definiera en cut-off point för när ett vävnadsprov kan anses vara positivt för PD-L1, det finns cut-offs från allt mellan >1% till >50%. Detta utgör en barriär då man ska jämföra resultat med varandra. Utöver detta har PD-L1 endast två små hydrofila regioner, till vilka de immunohistokemiska detektionsantikropparna kan binda, ett problem speciellt vid formalin-fixerad, paraffin-inbäddade vävnadsprov. Biologiska hinder baserar sig på skillnaden mellan inflammatoriskt ökade nivåer av PD-L1 och de onkogenmediterade ökningarna av PD-L1. Kliniska studier görs inom anti-PD-1/PD-L1 immunoterapi, flest mot melanom, RCC (renal cell carcinoma) och NSCLC (non-small cell lung carcinoma). Imponerande resultat mot tidigare nämnda tumörer har nåtts via anti-PD-1/PD-L1 immunoterapi, speciellt genom användningen av nivolumab och pembrolizumab mot melanom, och är i U.S.A en möjlig första klara indikation för immunoterapi. Det är fortfarande viktigt att PD-L1 IHC förbättras, ju mer specifik vi lyckas få den, desto mer patienter kan besparas den autoimmuna toxiciteten som trots allt utgörs av anti-PD-1/PD-L1 immunoterapi [23].

Pembrolizumab (anti-PD-1-antikropp) togs i bruk år 2014 för behandling av NSCLC och melanom, och nyligen för behandling skivepitelkarcinom i huvud- och nackregionen. Nivolumab (anti-PD-1-antikropp) började år 2014 användas mot melanom och år 2015 mot melanom och RCC. Dessa båda är s.k. första generationens läkemedel och har bevisligen ökat överlevnaden hos patienter med tidigare nämnda tumörer [24]. Atezolizumab (anti-PD-L1-antikropp) undersöks inom vården av metastaserande NSCLC och urotelkarcinom. Durvalumab (anti-PD-L1-antikropp) undersöks för vården av NSCLC (fas III) och urotelkarcinom (fas III). Pidilizumab är ännu en anti-PD-1-antikropp som för stunden testas mot stora B-cellslymfom (fas II avklarad). Avelumab (anti-PD-L1-antikropp) har godkänts för behandlingen av metastaserande Merkelcellskarcinom (fas II) och NSCLC (fas III) [24].

Resultat i denna studie kan vägas mot tidigare studier som gjorts i ämnet. I studien Prognostic implications of PD-L1 expression in patients with soft tissue sarcoma av författarna Kim C m.fl. undersöktes 82 mjukvävnadssarkompatienter för expressionen av PD-L1 med undergrupperna epiteloidsarkom, synovialsarkom, rabdomyosarkom och Ewingsarkom. I den studien var 35 fall positiva för PD-L1 (35/82, 43%) [25]. Alla epiteloida sarkom var positiva (7/7, 100%), följt av synovialsarkom (10/19, 53%), rabdomyosarkom (12/32, 38%) och Ewing sarkom (6/18, 33%) [25]. Artikelns författare hävdar att det inte fanns någon tydlig skillnad i PD-L1 positiviteten med tanke på ålder, kön, tumörstorlek, läge, histologisk grad, kirurgisk resektion och adjuvant behandling, och att felkällor kan tänkas vara studiens lilla storlek.

Möjliga felkällor i vår studie kan vara att vi endast undersökt expressionen av PD-1 och PD-L1 bland mjukvävnadssarkom, och inte beaktat möjliga skillnader som kan basera sig på ålder, kön, adjuvant behandling och tumörstorlek och att vi, trots studiens omfattning, fortfarande har histologiska undergrupper vars N är under 100. Med detta taget i beaktan antyder resultaten ändå på att det finns en klar skillnad bland PD-L1 expressionen beroende på tumörens histologiska undergrupp.

I denna dag finns det fortfarande ingen specifik behandling för mjukvävnadssarkom, och en av de största utmaningarna med anti-PD-1/PD-L1 immunoterapi är fortfarande att med hjälp av IHC-baserad detektion tillförlitligt kunna avgöra vilken tumörhistologi, och speciellt vilka patienter, som skulle ha nytta av anti-PD-1/PD-L1 immunoterapi. Negativa PD-L1 vävnadsprov utesluter inte heller nyttan en patient kan ha av immunoterapeutisk behandling, ett vävnadsprov representerar en plats, en tid, och ett skede av tumörens utveckling. Slutligen kan vi konstatera att stött av denna studies resultat kan PD-1/PD-L1 axeln anses var ett lovande terapeutiskt mål för behandlingen av patienter med mjukvävnadssarkom och expressionen är beroende av den histologiska undergruppen.

Referenser

- [1] Sampo MM, Ronty M, Tarkkanen M, Tukiainen EJ, Bohling TO, Blomqvist CP. Soft tissue sarcoma - a population-based, nationwide study with special emphasis on local control. *Acta Oncol* 2012;51:706-12.
- [2] Sampo MM, Klintrup K, Tukiainen EJ, Bohling TO, Blomqvist CP. Improved prognosis in soft-tissue sarcoma of extremity and trunk wall. *Acta Orthop* 2016;1-5.
- [3] Potter DA, Glenn J, Kinsella T, Glatstein E, Lack EE, Restrepo C, et al. Patterns of recurrence in patients with high-grade soft-tissue sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1985;3:353-66.
- [4] Coindre JM. Grading of soft tissue sarcomas: review and update. *Arch Pathol Lab Med* 2006;130:1448-53.
- [5] Trojani M, Contesso G, Coindre JM, Rouesse J, Bui NB, de Mascarel A, et al. Soft-tissue sarcomas of adults; study of pathological prognostic variables and definition of a histopathological grading system. *International journal of cancer* 1984;33:37-42.
- [6] Miettinen M. Liposarcoma. In: Anonymous, editor. *Diagnostic Soft Tissue Pathology*. 1. Hong Kong: Churchill Livingstone; 2003. p. 227-39.
- [7] Fletcher CDM, World Health Organization., International Agency for Research on Cancer. *WHO classification of tumours of soft tissue and bone*. 4th ed. Lyon: IARC Press; 2013. 468 p. p.
- [8] Wiklund TA, Blomqvist CP, Raty J, Elomaa I, Rissanen P, Miettinen M. Postirradiation sarcoma. Analysis of a nationwide cancer registry material. *Cancer* 1991;68:524-31.
- [9] Evans DM, Williams WJ, Kung IT. Angiosarcoma and hepatocellular carcinoma in vinyl chloride workers. *Histopathology* 1983;7:377-88.
- [10] Sampo M, Tarkkanen M, Huuhtanen R, Tukiainen E, Bohling T, Blomqvist C. Impact of the smallest surgical margin on local control in soft tissue sarcoma. *The British journal of surgery* 2008;95:237-43.
- [11] Eilber FR, Mirra JJ, Grant TT, Weisenburger T, Morton DL. Is amputation necessary for sarcomas? A seven-year experience with limb salvage. *Annals of Surgery* 1980;192:431-8.
- [12] Mack LA, Crowe PJ, Yang JL, Schachar NS, Morris DG, Kurien EC, et al. Preoperative chemoradiotherapy (modified Eilber protocol) provides maximum local control and minimal

morbidity in patients with soft tissue sarcoma. *Annals of Surgical Oncology : The Official Journal of the Society of Surgical Oncology* 2005;12:646-53.

[13] Jebsen NL, Bruland OS, Eriksson M, Engellau J, Turesson I, Folin A, et al. Five-year results from a Scandinavian sarcoma group study (SSG XIII) of adjuvant chemotherapy combined with accelerated radiotherapy in high-risk soft tissue sarcoma of extremities and trunk wall. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2011;81:1359-66.

[14] Demetri GD, Chawla SP, von Mehren M, Ritch P, Baker LH, Blay JY, et al. Efficacy and safety of trabectedin in patients with advanced or metastatic liposarcoma or leiomyosarcoma after failure of prior anthracyclines and ifosfamide: results of a randomized phase II study of two different schedules. *J Clin Oncol* 2009;27:4188-96.

[15] van der Graaf WT, Blay JY, Chawla SP, Kim DW, Bui-Nguyen B, Casali PG, et al. Pazopanib for metastatic soft-tissue sarcoma (PALETTE): a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 3 trial. *Lancet* 2012;379:1879-86.

[16] D'Angelo SP. Manipulating the Immune System With Checkpoint Inhibitors for Patients With Metastatic Sarcoma. *Am Soc Clin Oncol Educ Book* 2016;35:e558-64.

[17] Tumeh PC, Harview CL, Yearley JH, Shintaku IP, Taylor EJ, Robert L, et al. PD-1 blockade induces responses by inhibiting adaptive immune resistance. *Nature* 2014;515:568-71.

[18] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12:252-64.

[19] Reck M, Rodriguez-Abreu D, Robinson AG, Hui R, Csoszi T, Fulop A, et al. Pembrolizumab versus Chemotherapy for PD-L1-Positive Non-Small-Cell Lung Cancer. *The New England Journal of Medicine* 2016;375:1823-33.

[20] Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med* 2009;29:123-7.

[21] Prichard JW. Overview of automated immunohistochemistry. *Arch Pathol Lab Med* 2014;138:1578-82.

[22] Yamashita S. Heat-induced antigen retrieval: mechanisms and application to histochemistry. *Prog Histochem Cytochem* 2007;41:141-200.

[23] Patel SP, Kurzrock R. PD-L1 Expression as a Predictive Biomarker in Cancer Immunotherapy. *Mol Cancer Ther* 2015;14:847-56.

[24] Diggs LP, Hsueh EC. Utility of PD-L1 immunohistochemistry assays for predicting PD-1/PD-L1 inhibitor response. *Biomark Res* 2017;5:12.

[25] Kim C, Kim EK, Jung H, Chon HJ, Han JW, Shin KH, et al. Prognostic implications of PD-L1 expression in patients with soft tissue sarcoma. *BMC Cancer* 2016;16:434.